

Aus der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## **Dissertation**

# **Einfluss von Restaurationsspalten auf die Progression von Residualkariesläsionen *in vitro***

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Charlotta Susanne Diederich**

aus Mölln

Datum der Promotion: 06.03.2020



Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Publikation 1: Falk Schwendicke, Charlotta Diederich, Sebastian Paris, Restoration gaps needed to exceed a threshold size to impede sealed lesion arrest in vitro, Journal of Dentistry, 2016

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>Abstract (English).....</b>	<b>7</b>
<b>Abstrakt (Deutsch) .....</b>	<b>8</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>9</b>
1.1. Kariesepidemiologie und Kariesentstehung .....	9
1.2. Behandlungsstrategien .....	12
1.3. Restaurationsspalten und versiegelte Bakterien .....	13
1.4. Fragestellung: Ziel der Arbeit.....	14
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
2.1.1. Herstellung und Demineralisation der Probenkörper.....	16
2.1.2. Aufbau des Biofilmmodells .....	17
2.1.3. Medien und Bakterien.....	18
2.1.4. Restauration und Spaltherstellung.....	20
2.1.5. Versiegelungsperiode .....	22
2.2. Evaluation des bakteriellen Überlebens .....	25
2.3. Statistische Analyse.....	25
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>26</b>
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>28</b>
4.1. Ergebnisse der Studie .....	28
4.2. Diskussion der Methodik.....	30
4.2.1. Versuchsdurchführung.....	30
4.2.2. Probenkörperdesign .....	30
4.2.3. Medien und Biofilmmodell.....	31
4.2.4. Versiegelungsperiode .....	32
4.2.5. Bakterieller Überleben.....	33

4.3. Ausblick .....	33
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>35</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>36</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>41</b>
7.1. Materialien .....	41
7.2. Medien .....	42
7.3. Vorversuch zur Spalthöhe- und Kontinuität .....	43
7.4. Vorversuch zu Belastungseinflüssen auf Spaltgrößen .....	43
<b>8. Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>44</b>
<b>9. Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen.....</b>	<b>45</b>
<b>10. Lebenslauf .....</b>	<b>46</b>
<b>11. Danksagung.....</b>	<b>47</b>

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Entstehung einer kariösen Läsion und Therapieansätze

Abbildung 2: Graphische Darstellung des Hauptversuches

Abbildung 3: Graphische Darstellung der Dentinprobenherstellung

Abbildung 4: Graphische Darstellung Aufbau Biofilmmodell

Abbildung 5: Schematische Zyklusdarstellung

Abbildung 6: Graphische Darstellung der Spaltrestorationen

Abbildung 7: Graphische Darstellung Sagittalschnitt eines restaurierten  
Probenkörpers

Abbildung 8: Graphische Darstellung Metallscheibe mit Probenkörper

Abbildung 9: Graphische Darstellung des Hauptversuches

Abbildung 10: Bakteriellles Überleben in Abhängigkeit von der Spaltgröße

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Verschiebung der Munderkrankungen in das höhere Lebensalter

Tabelle 2: Zusammensetzung der MRS-Bouillon

## Abstract (English)

*Objectives:* After selective excavation, bacteria are sealed beneath restorations. Leaking restorations could maintain carbohydrate-supply, leading to lesion progression and pulp damage. It is unclear if fluid (and thereby carbohydrate) exchange occurs through any interfacial gaps, or if such exchange only occurs in case gaps exceed a certain threshold size. We investigated how different restoration gap sizes impact on survival of sealed bacterial in vitro.

*Methods:* Bacterially contaminated artificial residual lesions were induced on the pulpo-axial walls of standardized dentin micro-cavities using acetic-acid demineralization and a continuous-culture *Lactobacillus rhamnosus* biofilm-model. Adhesive restorations with different gap sizes (0/100/200/400  $\mu\text{m}$ ) were placed (n = 24/group). Restorations were submitted to cyclic loading (42 g/0.2 Hz) under highly cariogenic conditions in a mastication-simulating artificial mouth. After 25 days, the number of sealed viable bacteria was determined as colony-forming units.

*Results:* After 25 days, CFU were significantly reduced in all groups (-99.99 %,  $p < 0.001$ /Mann-Whitney). Significantly more viable bacteria remained in restorations with gaps  $\geq 200 \mu\text{m}$  ( $p < 0.001$ ).

*Conclusions:* Restoration gaps needed to exceed a threshold size to impede lesion arrest in vitro. There is great need to better understand why such threshold exists and which factors (mastication forces, restoration material, lesion location) could moderate the observed association.

*Clinical significance:* A certain gap sizes was necessary to allow sufficient fluid exchange for bacterial survival in vitro. It is not possible to deduct clinical recommendations at present.

## Abstrakt (Deutsch)

*Ziel der Studie:* Bakterien werden nach einer selektiven Kariesexkavation unter Restaurationen versiegelt. Insuffiziente Restaurationen könnten die Substratzufuhr ermöglichen und zu einer Läsionsprogression und Schädigung der Pulpa führen. Es ist unklar, ob ein Flüssigkeits- (und damit Kohlenhydrat-) Austausch entlang jeglicher Restaurationsspalten stattfindet oder ob eine solche Flüssigkeitsdurchlässigkeit nur dann stattfindet, wenn der Restaurationsspalt einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Diese In-vitro-Studie untersuchte, welchen Einfluss unterschiedliche Spaltgrößen auf die Anzahl der überlebenden versiegelten Bakterien nehmen.

*Methoden:* Die pulpoaxialen Wände standardisierter boviner Dentinprobenkörper wurden demineralisiert und einem kontinuierlichen *Lactobacillus rhamnosus*-Biofilmmodell ausgesetzt. So wurden bakteriell kontaminierte künstliche Residualläsionen induziert. Die Probenkörper wurden mit Kompositfüllungen unterschiedlicher Spaltmaße (0/100/200/400 µm) restauriert (n = 24/Gruppe). Die restaurierten Probenkörper wurden unter stark kariogenen Bedingungen in einem Kausimulator einer zyklischen Belastung (42 g/0,2 Hz) ausgesetzt. Nach einer Versuchsdauer von 25 Tagen wurde die Anzahl der versiegelten lebensfähigen Bakterien als koloniebildende Einheiten (KbE) bestimmt.

*Ergebnisse:* Nach 25 Tagen waren die KbE in allen Versuchsgruppen signifikant reduziert (-99.99 %,  $p < 0.001$ /Mann-Whitney). Ab einer Spaltgröße von  $\geq 200$  µm ( $p < 0.001$ ) waren wesentlich mehr lebensfähige Bakterien nachzuweisen.

*Schlussfolgerungen:* Restaurationsspalten, die einen bestimmten Schwellenwert überschreiten, verhindern eine Läsionsarretierung in vitro. Es ist erforderlich, in weiteren Studien zu untersuchen, warum ein solcher Grenzwert existiert und welche Faktoren (Kaukräfte, Restaurationsmaterial, Läsionsort) diesen Zusammenhang beeinflussen könnten.

*Klinische Relevanz:* Eine definierte Spaltgröße war erforderlich, um einen Flüssigkeitsaustausch und somit das bakterielle Überleben in vitro zu ermöglichen. Es ist derzeit nicht möglich, daraus klinische Empfehlungen abzuleiten.



# 1. Einleitung

## 1.1. Kariesepidemiologie und Kariesentstehung

Karies ist die häufigste chronische Erkrankung der Welt. Laut einem Ranking der Weltgesundheitsorganisation (WHO) über die Behandlungskosten für chronische Erkrankungen steht die Karies weltweit an vierter Stelle (1). In Deutschland wird über alle sozialen Schichten hinweg ein genereller Rückgang der schweren Parodontalerkrankungen und der Karieserfahrung bei Kindern verzeichnet; ein Trend, der unter anderem auf umfassende Präventionsmaßnahmen zurückzuführen ist (2). Weiterhin kann beobachtet werden, dass sich die Wahrscheinlichkeit des Erkrankungsbeginnes von Karies und parodontalen Erkrankungen ins höhere Alter verschiebt. Diese Entwicklung wird durch den Begriff „Morbiditätskompression“ beschrieben. (2) So haben beispielsweise ältere Senioren (75- bis 100-Jährige) im Jahr 2014 einen Mundgesundheitszustand wie jüngere Senioren (65- bis 74-Jährige) im Jahr 2005, siehe Tabelle 1. Insgesamt kann bei fast allen Alters- und sozioökonomischen Gruppen eine positive Entwicklung festgestellt werden.

Nur ein kleiner Teil der Bevölkerung hat nicht von diesem Trend profitiert (2). Ein geringer Individuenanteil einer Altersgruppe hat demnach die höchste Karieserfahrung (sog. Polarisierung). So sind behandlungsbedürftige Zähne bei den 12-Jährigen bspw. überhaupt nur bei 5,7 % der Kinder vorzufinden (2). Die Konzentration der Kariesverteilung führt trotz insgesamt sinkender Kariesprävalenz zu einem weiterhin ausgeprägten Therapiebedarf (3).

Tabelle 1: Verschiebung der Munderkrankungen in das höhere Lebensalter (2).

<b>Vergleichsgruppen</b>	<b>DMS IV und V (2005/2014) jüngere Senioren</b>	<b>DMS V (2014) ältere Senioren</b>
<b>Karieserfahrung (DMFT)</b>	22,1 / 17,7	21,6
<b>moderate und schwere Parodontalerkrankungen (Prävalenz)</b>	92,0 % / 64,6 %	90,0 %
<b>völlige Zahnlosigkeit (Prävalenz)</b>	22,6 % / 12,4 %	32,8 %

Die ökologische Plaquehypothese (4) ist die momentan akzeptierte Theorie zur Entstehung von Karies. Sie beschreibt, wie die übermäßige Zufuhr fermentierbarer Kohlenhydrate zu einer gestörten Homöostase des oralen Biofilms führt. Daraus resultiert eine Verschiebung des mikrobiellen Gleichgewichtes in Richtung einer aktiven kariogenen Mikroflora. Dies führt zu einer Selektion von azidurischen (säuretoleranten) und azidogenen (säurebildenden) Bakterien, während weniger säureresistente Stämme im Wachstum gehemmt werden (5, 6). Als Konsequenz entsteht aus einer physiologischen eine pathologische Biofilmzusammensetzung. Die metabolische Aktivität dieser Bakterien nach kariogener Ernährungsweise führt durch Entstehung organischer Säuren zu einer Verschiebung des pH-Wertes in der Plaque. Der pH-Wert erreicht ein für den Schmelz (pH-Wert 5,5) und das Dentin (pH-Wert 6,2) kritisches Niveau. Das führt zu einem Demineralisationsprozess der Zahnhartsubstanz (7) und nachhaltig zu den klinischen Symptomen einer Karies (8).

Die Entstehung einer kariösen Läsion und die entsprechenden möglichen Therapieansätze werden in Abbildung 1 veranschaulicht. Karies kann nicht nur durch die direkte Hemmung der Bakterien verhindert werden, sondern auch durch die Beeinflussung der Umweltfaktoren und Verhaltensweisen, die für das Bakterienwachstum und deren Stoffwechselaktivität förderlich sind (9). Unterschiedliche non-invasive Therapieansätze wie Mundhygienemaßnahmen, Fluoridzufuhr und Ernährungsberatung sind geeignet, die Entstehung von Läsionen zu verhindern sowie frühe Läsionen zu arretieren. Weitere Strategien sind beispielsweise

die Versiegelung oder Kariesinfiltration (sog. mikro-invasive Ansätze) oder restaurative Maßnahmen (invasive Ansätze).

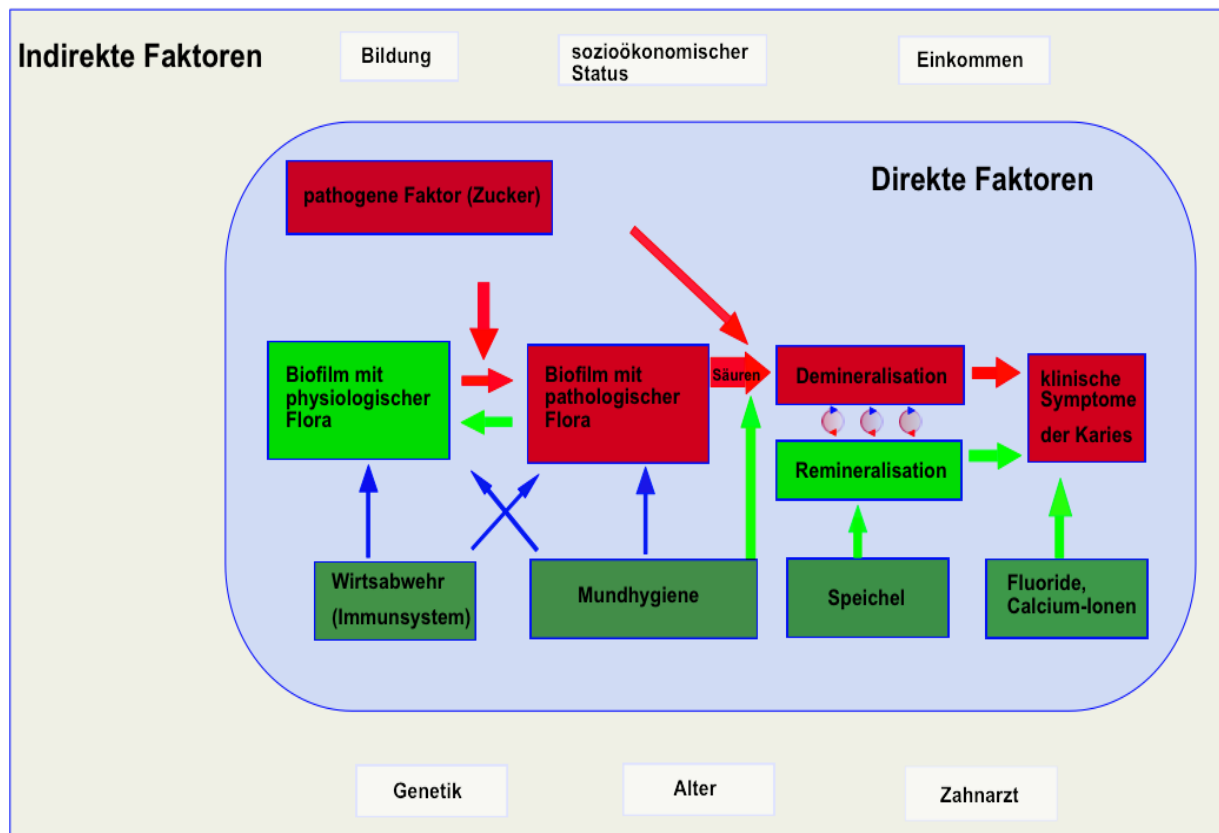


Abbildung 1: Entstehung einer kariösen Läsion und Therapieansätze, Abbildung modifiziert nach Paris et al. (2012) (10). Der übermäßige Konsum fermentierbarer Kohlenhydrate (Zucker: rot) führt zu einer bakteriell veränderten Biofilmbiozusammensetzung (pathologische Flora: rot). In Folge des erhöhten Metabolismus der vorrangig azidogenen und azidurischen Bakterien kommt es zur vermehrten Synthese organischer Säuren, die zur Demineralisation der Zahnhartsubstanz und letztlich zu den klinischen Symptomen einer Karies führen. Protektive Faktoren (dunkelgrün) nehmen unter anderem als non-invasive Therapieansätze direkten Einfluss auf den pathologischen Prozess einer Karies und können ihn verhindern bzw. lindern. Sie können an unterschiedlichen Stadien einer Karies Einfluss auf dessen Verlauf nehmen.

## 1.2. Behandlungsstrategien

Ausgehend von der Vorstellung, Karies sei eine Infektionserkrankung (11), wurden kariöse Läsionen traditionell durch vollständige Entfernung infizierter Zahnhartsubstanz und darauf folgenden restaurativen Maßnahmen zur Wiederherstellung der verloren gegangenen Zahnhartsubstanz behandelt. Auf dem Konzept der ökologischen Plaquehypothese aufbauend wird heute jedoch vermehrt die Läsionskontrolle durch non- oder mikro-invasive Behandlungskonzepte propagiert; eine restaurative Therapie wird erst für kavitierte Läsionen empfohlen (12). Das Ziel dieser restaurativen Maßnahmen besteht in der Wiederherstellung der Funktion, Form und Ästhetik und der Schaffung reinigungsfähiger Oberflächen.

Die Kariesexkavation ist der Schritt der Entfernung kariösen Gewebes, der der eigentlichen Restauration voraus geht. Die Exkavation diene herkömmlicherweise u.a. der Entfernung bakteriell kontaminierten und demineralisierten Dentins (12). Traditionell wurde dabei eine nonselektive (vollständige) Exkavation empfohlen, bei der peripher und auch zentral jegliches kariöse Dentin vollständig entfernt wurde. Noch immer ist die nonselektive Kariesexkavation unter Zahnärzten weit verbreitet (13, 14). Gerade in Pulpanähe birgt diese Exkavationsmethode jedoch Risiken für den Erhalt der Pulpaintegrität und -vitalität. Daher wird heute vermehrt eine sogenannte selektive (unvollständige) Kariesentfernung für tiefe Läsionen bei vitalen Zähnen angewandt. Bei der selektiven Exkavation wird zentral (in Pulpanähe) kariöses (weiches) Dentin unter der definitiven Restauration belassen (15). Kariöses Gewebe wird dabei durch das Platzieren einer suffizienten Restauration versiegelt, die Nährstoffversorgung der Bakterien unterbrochen und die Läsionsaktivität kontrolliert (16). Aufgrund des Substratmangels können die Bakterien keinen kariogenen Einfluss auf den Zahn mehr ausüben (17) und die Zahl der vermehrungsfähigen Bakterien in der Läsion sinkt (16, 18). Folglich kommt es zur Inaktivierung zurückgebliebener („residualer“) Läsionen (16, 19). Mitunter kann es sogar zur Remineralisierung solcher versiegelten Läsionen kommen, wobei sowohl Pulpaflüssigkeit als auch restaurative Materialien als Minerallieferanten agieren können (20). In der Peripherie wird hingegen auch bei der selektiven Exkavation bis ins harte Dentin exkaviert, um anschließend eine gut unterstützte, adhäsiv verankerte langlebige Restauration platzieren zu können, die zudem dicht versiegelt. Eine weitere Exkavationsstrategie stellt die schrittweise

Kariesentfernung dar. Bei der Methode wird zweizeitig kariöses Dentin entfernt, indem zunächst selektiv bis zum weichen Dentin exkaviert und temporär restauriert wird. Nach 6-12 Monaten wird erneut exkaviert, so dass zentral festes Dentin verbleibt und daraufhin definitiv restauriert werden kann (21). In Deutschland wird die schrittweise Exkavation nur wenig angewandt (14).

### **1.3. Restaurationsspalten und versiegelte Bakterien**

Zentrale Voraussetzung einer erfolgreichen Arretierung von unter einer Restauration belassenen kariösen Läsion ist deren suffiziente Versiegelung. Sobald versiegelte Bakterien über Restaurationsspalten Zugang zu fermentierbaren Kohlenhydraten im Sinne einer Flüssigkeitsdurchlässigkeit (Mikroleakage) (22) haben, könnte es zur Bakterienproliferation und Kariesprogression kommen (23). So sind bspw. Fissurenversiegelungen eine wirksame Maßnahme zur Kariesprävention (24), wenn ein dichter adhäsiver Verbund gewährleistet wird. Speichelkontaminierte Oberflächen unter Versiegelungen weisen hingegen deutlich mehr Mikroleakage auf (25). Spalten unter Restaurationen, die auf unsachgemäßes Platzieren der Restauration oder Altersungsprozesse zurückgehen, würden demnach im Rahmen einer selektiven Exkavation von Nachteil sein.

Die Auswirkungen von Restaurationsspalten sind gerade im Bereich der Sekundärkaries (Karies am Rand von Restaurationen) gut untersucht. (26-28). So hat die Spaltgröße direkten Einfluss auf die Entwicklung von Sekundärkaries entlang der Kavität; je breiter der Spalt, desto größer die resultierende Läsion (27). Schwellenwerte von ca. 30 µm Spaltgröße wurden in der Literatur als ausreichend angegeben, um ein Flüssigkeits- und/oder Bakterieneindringen unter einer Restauration und die anschließende Induktion von Sekundärkaries zu ermöglichen (26, 29). Die berichteten Schwellenwerte schwanken allerdings stark zwischen den Studien; dies ist möglicherweise methodisch bedingt. Neuste Studien weisen u.a. auf den Einfluss von zyklischen Kaukräften auf den Flüssigkeits- und Bakterientransport in die Restaurationsspalten hin (30-32), wobei „Pumpeffekte“ diskutiert werden. Die zyklische Belastung begünstigt die bakterielle Penetration (30) und den Flüssigkeitsaustausch, wodurch auch kleine Spalten bereits mit der Induktion von Sekundärkaries assoziiert sein können (30, 31). Ob Restaurationsspalten unter dem

Einfluss zyklischer Kaukräfte auch auf die Arretierung versiegelter Läsionen Auswirkungen haben, ist unklar. Demnach sind bisher auch keine Grenzspaltgrößen definiert worden, ab denen eine Arretierung der versiegelten Läsion unwahrscheinlicher wird.

#### **1.4. Fragestellung: Ziel der Arbeit**

Die Auswirkungen von Restaurationsspalten auf das Überleben versiegelter Bakterien sind bisher nicht bekannt, aber relevant, um die Anwendbarkeit der selektiven Exkavation beurteilen zu können. Da klinische Untersuchungen hier u.a. aus ethischen Gründen ausscheiden und zudem methodologische Schwierigkeiten (Standardisierung der Spaltgrößen, Umgebungsfaktoren, Kaukräfte) unvermeidbar sind, wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation eine In-vitro-Studie durchgeführt, die das Überleben versiegelter Bakterien in Abhängigkeit von der Restaurationsintegrität (Spaltgröße) untersuchte. Die Hypothese lautete, dass mit zunehmender Spaltgröße auch die Anzahl der überlebenden versiegelten Bakterien signifikant ansteigt.

## 2. Material und Methoden

Der Versuchsablauf ist in Abbildung 2 graphisch dargestellt. In insgesamt 120 Probenkörpern wurden demineralisierte Läsionen hergestellt und bakteriell kontaminiert. Diese wurden anschließend versiegelt, wobei Restaurationen mit verschiedenen Spaltgrößen zum Einsatz kamen. Die Probenkörper wurden dann einer simulierten Versiegelungsperiode in einem sog. Mastikatorischen Biofilmmodell ausgesetzt, bei dem parallel Bakterien kultiviert und zyklische Kaukräfte ausgeübt wurden. Vor und nach der Versiegelungsperiode wurde die Zahl der vermehrungsfähigen Bakterien in den Läsionen quantifiziert, um das bakterielle Überleben ermitteln zu können.

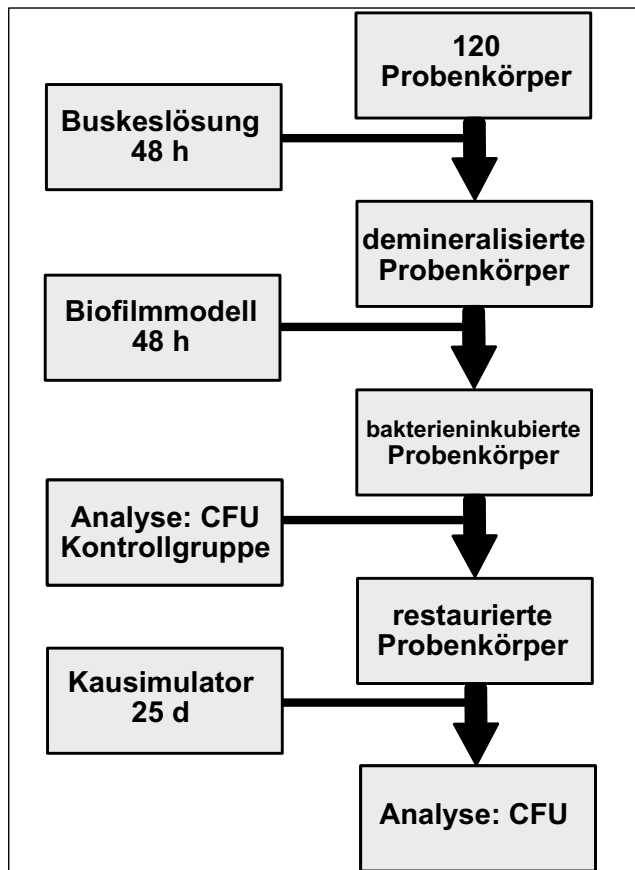


Abbildung 2: Graphische Darstellung des Hauptversuches.

### 2.1.1. Herstellung und Demineralisation der Probenkörper

Als Ausgangsmaterial zur Herstellung der Proben dienten bovine Incisivi (Unifleisch Schlachthof, Erlangen). Die Lagerung erfolgte in 0,5 % Chloramin T- Lösung bei 4°C (Kühlschrank, AEG Santo, Electrolux Hausgeräte, Nürnberg). Die Incisivi wiesen keine kariösen Läsionen oder sonstige Beschädigungen auf. Die Entfernung des Desmodonts fand mithilfe von Skalpell (Aesculap Sicherheitsskalpell, Braun, Melsungen) sowie ultraschallunterstützt (Ultraschallscaler, Sirona Dental, Bensheim) statt. Die Zahnkronen wurden von den Wurzeln getrennt (Bandsäge 300cl, 0,2 mm, Exakt Apparatebau, Norderstedt) und die Wurzeln längs durchsägt, so dass jeweils zwei annähernd „C“-förmig abgerundete Dentinprobenkörper entstanden (Abb. 3).

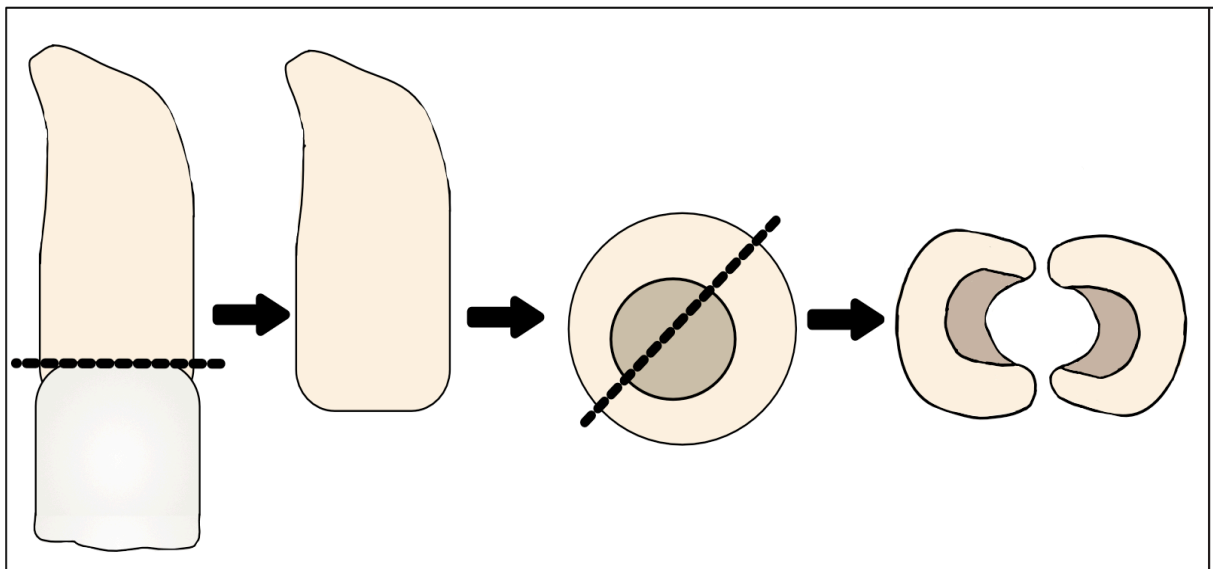


Abbildung 3: Graphische Darstellung der Dentinprobenherstellung. Das bovine Wurzeldentin wurde von den Kronen getrennt und in vertikaler Richtung durchsägt. Aus einer Zahnwurzel entstanden jeweils zwei annähernd „C“-förmige Dentinprobenkörper.

Die beiden zum Pulpenkavum gewandten Flächen wurden mit Keramikbohrern (REF 806314, Hager & Meisinger, Neuss) rechtwinklig gestaltet und anschließend poliert (Mikroschleifsystem 400CS, Schleifpapier 1200, 2400 und 4000, Buehler, Düsseldorf). Mithilfe einer Bandsäge wurden die bearbeiteten Wurzeln in horizontaler Richtung in mehrere „L“-förmige Dentinblöcke gesägt. Alle „L“-förmigen Dentinproben wiesen nach der Bearbeitung ein annähernd gleiches Maß von 5 × 5 × 6 mm auf. Die Flächen der



Probenkörper wurden mit säureresistentem Nagellack (Rival de Loop, Rossmann, Hannover) abgedeckt. Ausgenommen war eine der beiden zum Pulpenkavum gewandten Flächen. In diesem pulpoaxialen Fenster (2 × 2 mm) sollte im Weiteren eine kariöse Läsion induziert werden.

Insgesamt wurden 120 Probenkörper hergestellt. Mithilfe einer Silikonform wurden drei Platten aus Methylmethakrylat (Technovit 4071, Heraeus Kulzer, Hanau) gegossen. Die Technovitplatten besaßen eine aus Technovit gegossene, 2 mm hohe und breite Reling. Die Probenkörper (40 Probenkörper/Technovitplatte) wurden mit ihrer Unterseite auf die Technovitplatten mittels Sekundenkleber (UHU dent, UHU, Bühl) fixiert. Die Platten wurden über 48 Stunden bei 4 °C in 1 l Buskeslösung (pH 5,0; 50 mM CH<sub>3</sub>COOH, 3 mM CaCl<sub>2</sub> × H<sub>2</sub>O, 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>, 6 mM MHDP) gelagert. So konnte eine Demineralisation im Bereich des pulpoaxialen Fensters ermöglicht und eine demineralisierte Läsion induziert werden. Eine Messsonde (InLab Micro, Mettler-Toledo, Gießen) maß täglich den pH-Wert, der je nach Bedarf mit HCl (Roth, Karlsruhe) oder 10 M KOH korrigiert wurde. Die Proben wurden nach der Demineralisation mit destilliertem Wasser abgespült (Ampuwa, Fresenius Kabi, Bad Homburg).

### **2.1.2. Aufbau des Biofilmmodells**

Zur bakteriellen Kontamination der geschaffenen Läsionen kam ein Biofilmmodell zum Einsatz. Drei Pipettenboxen (Quality Pipette Tips, Sarstedt, Nümbrecht) wurden wie folgt für das Biofilmmodell präpariert: In den abnehmbaren Deckeln wurden jeweils drei Bohrungen vorgenommen. Zwei Bohrungen erfolgten mittig, die Dritte im Deckelrandbereich (Durchmesser ca. 4 mm). Anschließend wurden Pipettenspitzen positioniert. Die beiden mittig befestigten Pipettenspitzen dienten der Zufuhr von Nährmedium und Bakterienlösung über Zuflussschläuche (Silicone Tubing, VWR International, Darmstadt, Innendurchmesser 4 mm). In das dritte Bohrloch im Deckelrandbereich wurde ein 1 m langer Silikonschlauch von 4 mm Durchmesser fixiert, der 0,5 cm über den Böden der Boxen endete und den Abfluss der Medien sicherte. Mit Sterilisationsband wurden alle Öffnungen und Deckelränder verschlossen.

Die drei Boxen inklusive der Probenkörper und den angebrachten Schläuchen wurden autoklaviert (121 °C, 2,1 Bar, 34 min, Tuttnauer 3870 ELV, Biomedis, Gießen). Die Zu- und Abfuhr von Medien wurde über 3-Stopper-Schläuche (ISMATEC, Wertheim) und eine Multikanalpumpe (8152 Standard, MCP, Glattbrugg) bzw. eine Peristaltikpumpe (Seko, Mainz-Kastel) realisiert. Die Medien (s.u.) wurden in einer 5 l Flasche (Schott GL 45, DURAN Laborflasche, DURAN Group, Wertheim/Main) gelagert (Abb. 4).

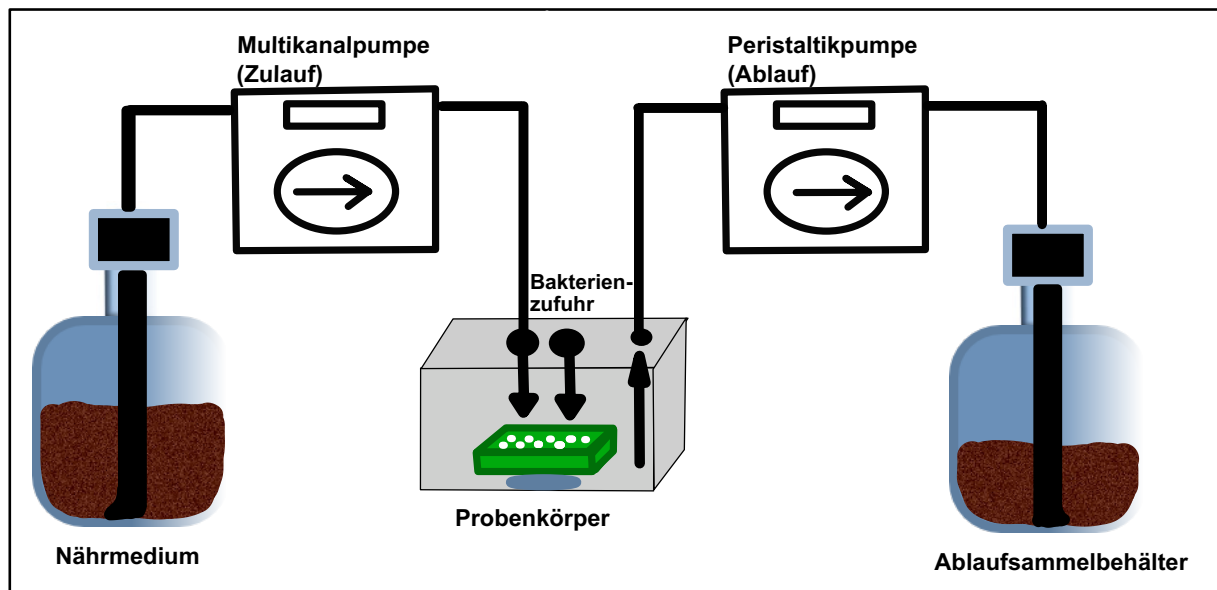


Abbildung 4: Graphische Darstellung des Biofilmmodells mit Nährmediumzufluss- und ablauf.

### 2.1.3. Medien und Bakterien

Als Kulturmedium wurde MRS (deMan-Rogosa-Sharpe, Roth, Karlsruhe) eingesetzt. Das Medium wurde zudem mit 2 % Saccharose (D(+)-Saccharose, Roth) versetzt (MRS-S). Als Bakterienstamm kam *Lactobacillus rhamnosus* (LGG, DSM 20247, DSMZ, Braunschweig) zum Einsatz. LGG ist ein klassischer Vertreter aller Progressionsstadien einer Karies (33, 34) und kommt u.a. in großen Zahlen in tiefen kariösen Läsionen vor.

Mithilfe computergesteuerter Medienz- und abfuhr wurde ein kontinuierlich wachsender Biofilm auf den Läsionen erzeugt und eine Kontamination der Läsionen mit LGG erreicht (33). Im Vorfeld wurde LGG über 12 Stunden aufgetaut und auf MRS-Agarplatten (Roth) ausplattiert. Die LGG-Kolonien (37 °C, anaerobe Umgebung)

wuchsen innerhalb von 48 Stunden auf den MRS-Agarplatten im Brutschrank (Venticell 404, MMM Medcenter, Planegg). Einhundert Milliliter MRS-S-Bouillon wurden mit einer *LGG*-Kolonie beimpft und weitere 24 Stunden im Falcon (Falcon-Röhrchen, Zentrifugenröhrchen, 50 ml, VWR, Darmstadt) als Bakteriensuspension im Brutschrank gelagert. Die Bakterieninkubation der Proben erfolgte im Biofilmmodell bei 37 °C und 100 % Luftfeuchtigkeit (Venticell, MMM Medcenter, Planegg). Die Durchführung und Programmierung der Pumpen erfolgte nach einem definierten Schema (Abb. 5). Im Anschluss an die Bakterieninkubation wurden bei 24 Probenkörper (Kontrollgruppe) die Zahl der in der Läsion vorhandenen Bakterien bestimmt (siehe Kapitel 2.2).

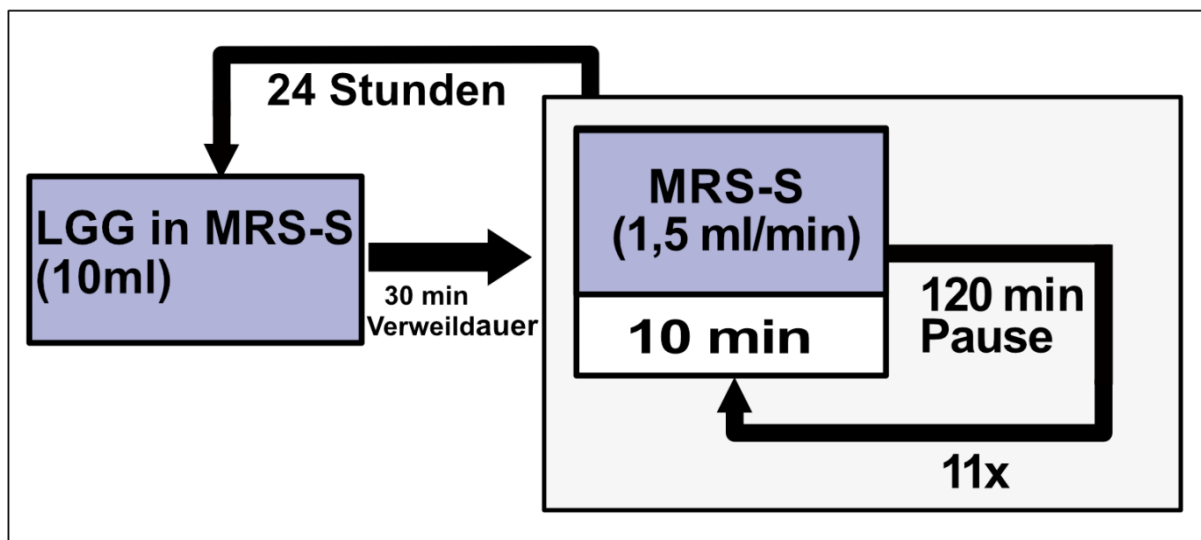


Abbildung 5: Schematische Zyklusdarstellung. Einmal täglich wurden je 10 ml bakterieninkubierte MRS-S- Bouillon auf die Probenkörper gegeben. Nach einer 30-minütigen Verweildauer der Bakteriensuspension erfolgte die zusätzliche Zufuhr von MRS-S. Über einen zehnminütigen Zeitraum verteilten sich 15 ml MRS-S-Bouillon auf die Proben. Daraufhin pausierte die Pumpe für einen Zeitraum von 120 min und begann daraufhin wieder mit dem zehnminütigen Zyklus (28 Umdrehungen/min, Flowrate: 1,169 ml/min, Schlauchdurchmesser: 0,76 mm, circa 21 Zyklen, kein Speichel). Dieser Zyklus wiederholte sich über einen Zeitraum von 48 Stunden. Nach dieser Kultivierungszeit waren die bereits demineralisierten Läsionen ausreichend mit *LGG* kontaminiert.

#### 2.1.4. Restauration und Spaltherstellung

Im Anschluss an die Kultivierungsphase sollten die Probenkörper mittels einer spalthaften Restauration versiegelt werden. Der restaurative Vorgang erzeugte zentral auf den Probenkörpern auf Höhe des Läsionsbereichs ein definiertes Spaltmaß. Um die Probenkörper hierfür vorzubereiten, wurde zu Beginn der Restaurations- und Spaltherstellung der Biofilm auf den Probenkörper mit NaCl-Lösung (Braun, Melsungen) unter sterilen Bedingungen (Bench, Bleyemehl Reinraumtechnik, Inden) abgespült. Nach der Reinigung wurde der zuvor angebrachte Nagellack, der die Flächen der Probenkörper bedeckte, mittels steriler Skalpelle an der zum Pulpenkavum gewandten Seite entfernt. Der Nagellack auf den Außenflächen wurde belassen. Bei der Entfernung des Nagellacks wurde darauf geachtet, dass die bakteriell kontaminierten Läsionen nicht beschädigt wurden. Die Restauration und Spaltherstellung an den Probenkörpern wird in Abbildung 6 und 7 graphisch dargestellt und erläutert.

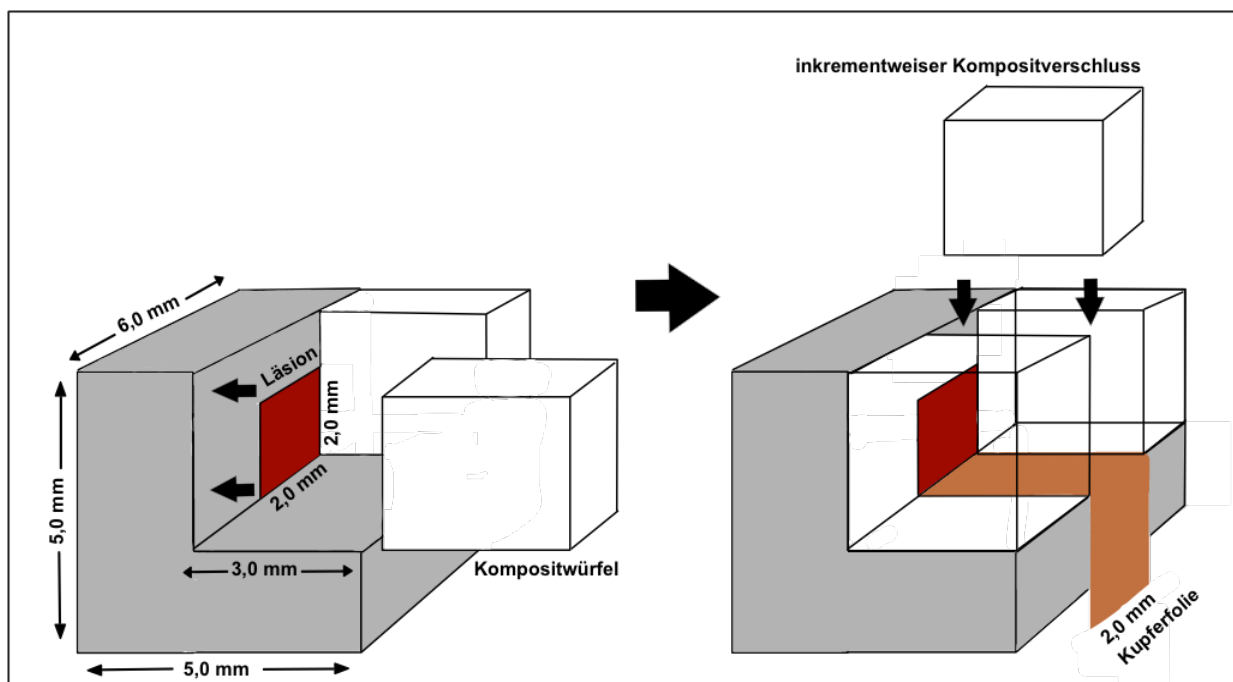


Abbildung 6: Graphische Darstellung der Spaltrrestaurationen. Herstellungsprozess einer spalthaften Restauration im Bereich der Residualläsion, die durch den roten Bereich dargestellt ist. Die randständigen Flächen (grau), die die künstlich hergestellte 2 × 2 mm kariöse Läsion (rot) seitlich begrenzten, wurden für den restaurativen Vorgang wie folgt vorbereitet: Die Bereiche wurden zunächst mit Luft verblasen,

konditioniert (Scotchbond Universal, 3M Espe, St. Paul, USA: 20 s einmassieren, 5 s verblasen) und 10 s mit einer LED-Polymerisationslampe (Valo, Ultradent, Salt Lake City, USA) mit einer Intensität von 1400 mW/cm<sup>2</sup> lichtgehärtet. Das bakterieninkubierte Fenster (rot) wurde dabei nicht mit dem Adhäsiv benetzt. Nach der Lichthärtung wurden zwei vorpolymerisierte Kompositwürfel aus Tetric EvoCeram Komposit (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) auf die vorbehandelten randständigen Flächen, seitlich der Läsionsfläche, mit Tetric EvoFlow adhäsiv befestigt (LED-Polymerisationslampe (20 s)). Die Kompositwürfel (weiß) begrenzten die Läsion und simulierten somit die oralen und bukkalen Kavitätenwände. Die Kompositwürfel wurden im Vorfeld aus Kompositstangen hergestellt. Die Kompositstangen wurden mithilfe einer Negativform aus Elastomere-Abformbasismasse (Silaplast futur, Detax, Ettlingen) aus Tetric EvoCeram geformt, 40 s lichtpolymerisiert, plan geschliffen und poliert. Die Herstellung der ca. 3 × 3 × 2 mm großen Würfel durch Zersägen der Stangen erfolgte mithilfe der EXAKT-Trennmaschine. Der letzte Restaurationsschritt umfasste die Spaltherstellung. Hierfür wurden Kupferfolienstücke (Gemmelmetalle, Berlin) von 2 mm Breite und unterschiedlich standardisierter Foliendicken (100, 200, 400 µm) auf den Probenböden platziert (braun). Die zuvor beschriebenen Kompositwürfel begrenzten die Kupferfolie somit von bukkaler und oraler Seite. Nach peripher schloss die Folie bündig mit der simulierten Kariesläsion ab (siehe Anhang 7.3). Die Folie diente als Platzhalter für die Restaurationsspalten. Dann wurde mithilfe von Tetric EvoCeram Komposit der Bereich oberhalb der Folie bzw. zwischen den Kompositwürfeln (simulierte Kavitäten) adhäsiv verschlossen. Komposit wurde hierfür inkrementweise auf die Folie geschichtet, mit einem planen Stopfer komprimiert und lichtgehärtet. Nach der Polymerisation konnte die Folie unterhalb der Restauration komplett entfernt werden. Auf diese Weise fand die Bearbeitung von insgesamt 72 Probenkörpern (3 × n = 24) statt.

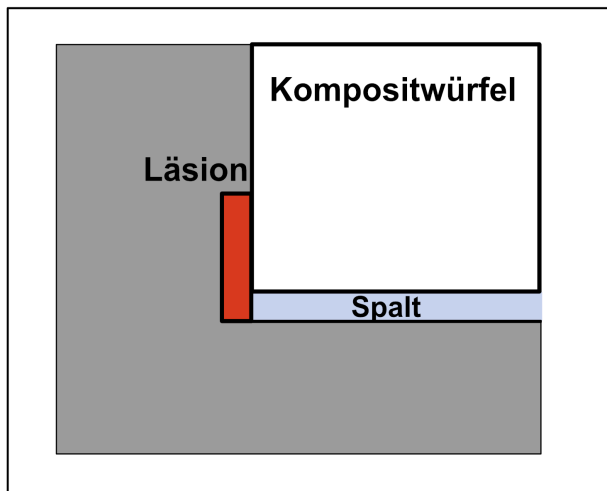


Abbildung 7: Graphische Darstellung Sagittalschnitt eines restaurierten Probenkörpers.

Für die Studie wurden insgesamt fünf Versuchsgruppen unterschieden. In der Kontrollgruppe wurden bei 24 Proben die Kavitäten nicht restauriert, bei den restlichen vier Gruppen wurden unterschiedliche Spaltgrößen simuliert. In einer Gruppe erhielten 24 Proben eine spaltfreie Restauration ( $0\ \mu\text{m}$ ), bei drei weiteren Gruppen wurden bei je 24 Proben die Spaltmaße  $100\ \mu\text{m}$ ,  $200\ \mu\text{m}$  und  $400\ \mu\text{m}$  nachgebildet. Von der Kontrollgruppe wurde direkt nach der Bakterieninkubation Dentin entnommen und die Bakterienzahl im Dentin bestimmt (siehe [Kapitel 2.2](#)).

#### 2.1.5. Versiegelungsperiode

Die versiegelten Probenkörper sollten anschließend einem mundhöhlenähnlichen Milieu sowie einer zyklischen Kaubelastung (Masikationssimulation) ausgesetzt werden. Dazu wurden die Probenkörper mit dualhärtendem Komposit (Luxacore, DMG, Hamburg) auf vier maßgefertigten Metallscheiben fixiert, die wiederum in eine Apparatur zur Lastverteilung eingespannt wurden. Diese erlaubte, die Last aus einem zweiachsigen Kausimulator, der über 4 Stempel verfügte, auf 96 Probenkörper zu verteilen (Abb. 8). Die optimale Last, die eine Spaltdeformation, jedoch keine signifikante Alterung der Probenkörper ermöglichte, wurde im Vorfeld ermittelt (siehe [Anhang 7.4](#)). Jede Probe wurde während der Belastungsphase (6 Sekunden) über einen Pin ( $0,5\ \text{mm}$  Durchmesser) mit 42 Gramm belastet.

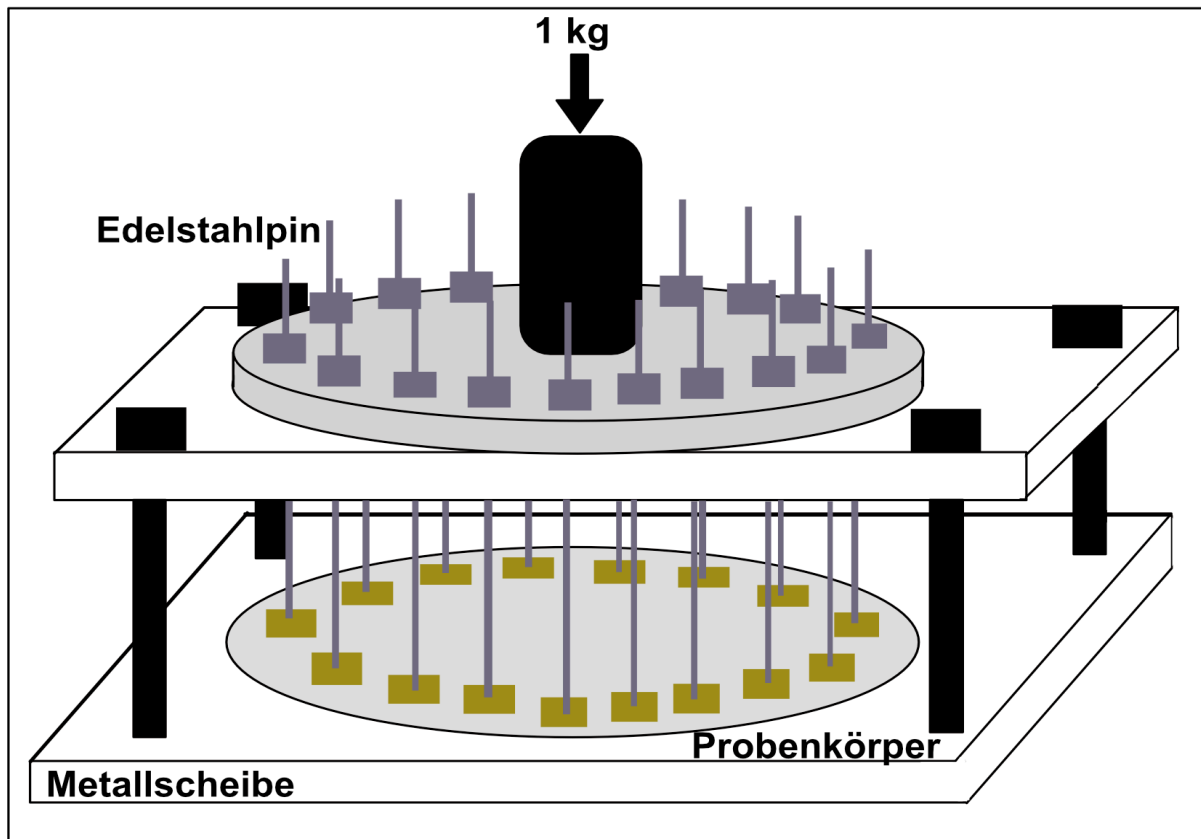


Abbildung 8: Graphische Darstellung Metallscheibe mit Probenkörper. Je 24 Edelstahlpins pro Metallscheibe, die in vertikaler und horizontaler Ebene ausgerichtet werden konnten, wurden zentral auf die jeweilige Kompositrestauration der Probenkörper positioniert.

Den Kern des Versuchsaufbaus bildete der Kausimulator inklusive der vier, mit den Probenkörpern bestückten Metallscheiben. Die gesamte Apparatur stand in einer Metallwanne, die durch einen transparenten Kunststoffdeckel annähernd dicht verschlossen wurde. Die Wanne war mit steriler 2 %-iger Saccharoselösung gefüllt. Das Medium umspülte die Probenkörper während der Versiegelungsperiode permanent. Um ein Austausch des Mediums zu ermöglichen, waren an die Metallwanne zwei Peristaltikpumpen angeschlossen. Sie beförderten als Zu- und Ablaufpumpensystem das Saccharosemedium einerseits aus dem vorgesetzten Saccharosebehälter in die Wanne hinein und andererseits aus der Wanne in einen Ablaufsammelbehälter heraus. Vor Gebrauch wurde das Medium in einem Wasserbad (KÖTTERMANN 3048, Wasserbad mit Umwälzung, Uetze) auf 37 °C erwärmt. Ein in der Wanne integriertes Thermometer überprüfte die Mediumtemperatur, die 37 °C betragen sollte. Bei einem Abfall der Mediumtemperatur wurden Heizschläuche aktiv,

die zu einem Temperaturanstieg führten. Die Schläuche waren entlang der Wannenaußenflächen mit Klebeband fixiert (Abb. 9).

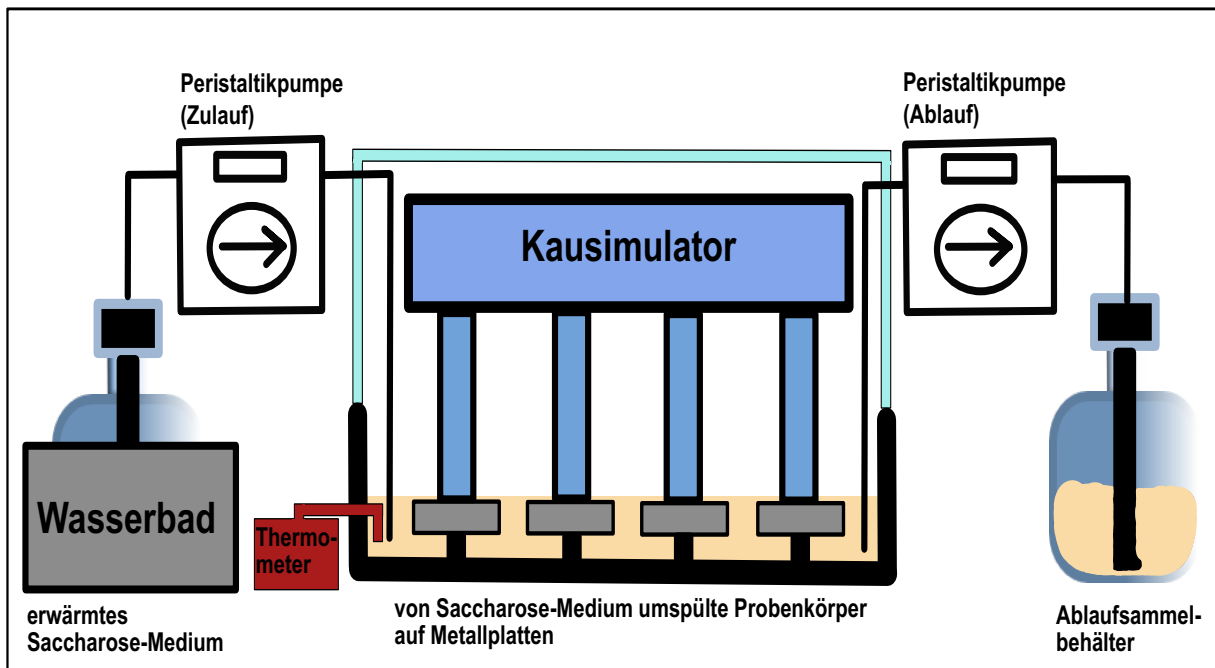


Abbildung 9: Graphische Darstellung des Hauptversuches. Das Fassungsvermögen der Wanne betrug 1,1 l. Das Saccharosemedium wurde einmal täglich durch das angeschlossene Zu- und Abpumpsystem ausgetauscht. Mithilfe der annähernd geschlossenen Kammer konnte eine sterile und kontinuierliche Atmosphäre simuliert werden. Es herrschte eine Luftfeuchtigkeit von 100 % und eine Temperatur von 37 °C.

Für den Versuch wurden die vier bestückten Metallplatten in die beschriebene maßgefertigte Biofilmkammer des Kausimulators (CS-4.8, Willytec, Feldkirchen-Westerham) montiert (Abb. 9). Der Hauptversuch verlief über 25 Tage und fand unter hochkariösen Bedingungen statt. Die Einstellungen des Kausimulators waren wie folgt: 6 Sekunden/Kauzyklus, 0,2 Hz Simulationsfrequenz, 1 kg bzw. 10 Newton/Platte, 42 Gramm/Probe. Nach 25 Tagen wurden die Probenkörper unter sterilen Bedingungen von den Metallscheiben entfernt. Mithilfe von sterilen Skalpellern wurden die Restaurationen vorsichtig von den L-förmigen Proben gelöst, ohne die artifizielle kariöse Läsion zu beschädigen. Während kurzer Lagerungszeiten wurden die Metallplatten inklusive Probenkörper in MRS-S-Bouillon bei 37 °C gelagert.



## **2.2. Evaluation des bakteriellen Überlebens**

Zur Bestimmung des Überlebens der versiegelten Bakterien wurde die Anzahl koloniebildender bakterieller Einheiten im Dentin vor und nach Versiegelung bestimmt. Hierfür wurde mit sterilen Rosenbohrern (1,4 mm; schmaler Schaft, Hager & Meisinger, Neuss) das bakterienkontaminierte Dentin exkaviert. Die Rosenbohrer wurden in Tubes (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) gelagert und deren Gewicht inklusive der Tubes im Vorfeld bestimmt (Feinwaage, Analytical Plus, Ohaus, Nänikon, Schweiz). So konnte das Nettogewicht des exkavierten kariösen Dentins ermittelt werden. Die Bestimmung der Anzahl versiegelter lebensfähiger Bakterien fand mit Hilfe von Verdünnungsreihen und Quantifizierung der koloniebildenden Bakterieneinheiten direkt nach der Bakterieninkubation (Kontrollgruppe) sowie nach 25 Tagen simulierter Probenkörperbelastung statt. In jedes Tube wurde zu den Rosenbohrern 1000 µl sterile NaCl-Lösung (0,9 %, Fresenius: physiologische Kochsalzlösung, Bad Homburg) pipettiert und mit dem Vortexer (Genie 2, BENDER & HOBEIN, Zürich, Schweiz) vermischt. Von dieser Lösung wurde 100 µl zu 900 µl NaCl-Lösung gegeben und durchmischt. MRS-Agarplatten wurden mit jeweils 100 µl der Lösung beimpft, um die Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  zu erzeugen. Weitere 100 µl der Verdünnung wurde zu 900 µl NaCl-Lösung gegeben ( $10^{-2}$ ). Von der  $10^{-2}$ -Verdünnung wurde 100 µl zu 900 µl NaCl-Lösung gegeben, durchmischt und auf Agarplatten ausplattiert, um die Verdünnungsstufe  $10^{-3}$  herzustellen. Die Agarplatten wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub> Begasungsbrutschrank, Heraeus Kulzer, Hanau) über 48 Stunden gelagert. Unter idealen Wachstumsbedingungen fand eine Bakterienvermehrung statt, die visuell nachgewiesen werden konnte, so dass die Kolonien bildenden Einheiten (KbE) pro mg Dentin (KbE/mg) berechnet wurden.

## **2.3. Statistische Analyse**

Die statistische Auswertung fand mithilfe von SPSS 20 (IBM, Armonk, USA) statt. Die Ergebnisse wurden auf Normalverteilung unter Verwendung des Shapiro-Wilk-Test kontrolliert. Der Mann-Whitney-U-Test verglich die verschiedenen KbE-Gruppen. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt und die Tests zweiseitig durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

Die künstlich induzierten Läsionen wiesen initial und im Median (25./75. Perzentile) 54 (16/166)  $\times 10^5$  KbE/mg auf. Nach der Versiegelung der Läsion waren im Durchschnitt noch 0,009 % der ursprünglichen Bakterien vorhanden ( $p < 0,001$ , Mann-Whitney).

Die Zahl der überlebenden versiegelten Bakterien war zwischen der 0  $\mu\text{m}$ - und der 100  $\mu\text{m}$ -Gruppe nicht signifikant verschieden ( $p > 0,05$ ). In Probenkörpern mit Spaltgrößen von  $\geq 200 \mu\text{m}$  verblieben hingegen deutlich mehr überlebende Bakterien ( $p < 0,001$ ), wobei erneut keine signifikanten Unterschiede zwischen den 200  $\mu\text{m}$  und 400  $\mu\text{m}$ -Gruppen festzustellen waren. Abbildung 10 veranschaulicht graphisch das bakterielle Überleben.

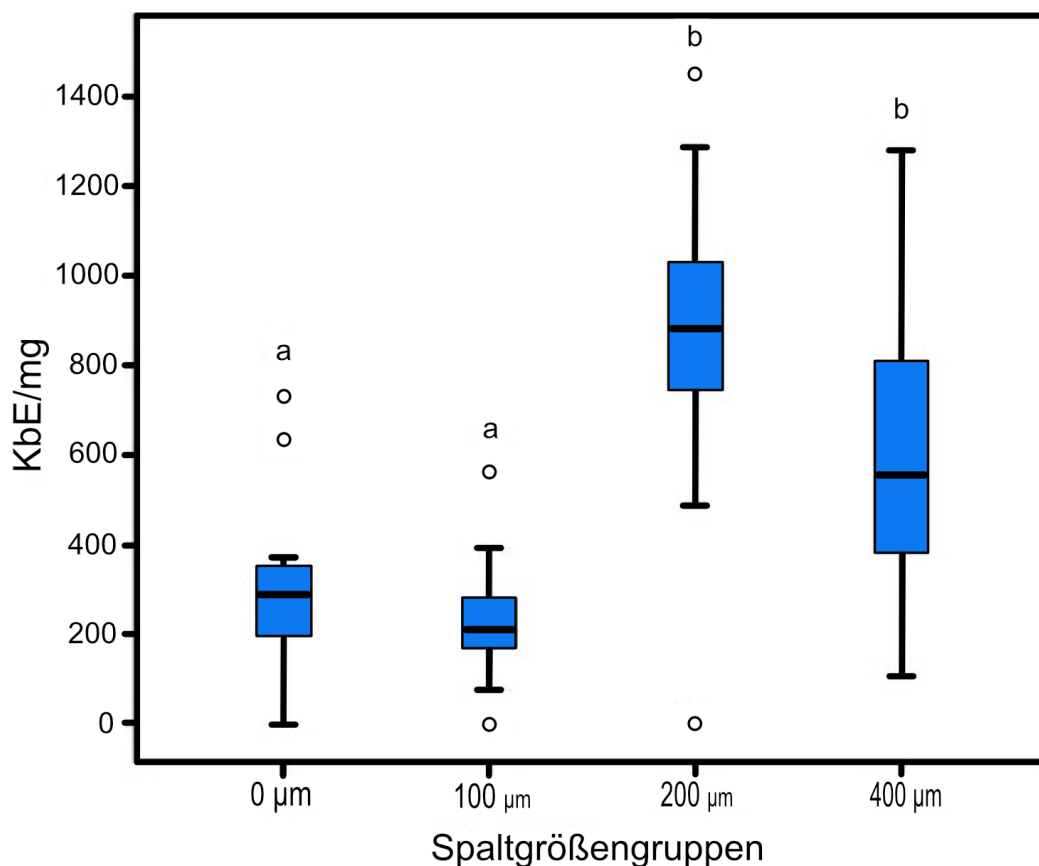


Abbildung 10: Bakterieller Überleben in Abhängigkeit von der Spaltgröße. Auf der y-Achse sind die Zahl der koloniebildenden Einheiten (KbE) von LGG pro mg exkavierten kariösen Dentins nach der 25-tägigen Mastikationsphase aufgezeichnet. Das Überleben von Bakterien unter Restaurationen mit 0, 100, 200 und 400  $\mu\text{m}$  Spalten

wurde untersucht. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ; Mann-Whitney) sind durch die verschiedenen Buchstaben (a, b) gekennzeichnet. Box und Linie: Interquartilbereich und Medianwerte. Antennen: Minimum- und Maximumwerte, Ausreißerwerte von  $\geq 1,5$  Boxenlängen sind durch ein o gekennzeichnet ( $n = 24/\text{Gruppe}$ ).

## **4. Diskussion**

Die Versiegelung bakteriell kontaminierter kariöser Läsionen, z.B. im Rahmen der selektiven Exkavation, basiert auf einer Unterbindung der Kohlenhydratzufuhr der versiegelten Bakterien und deren resultierender Inaktivierung (17). Insuffiziente Restaurationen mit Spaltbildungen könnten einen Flüssigkeitsaustausch entlang des Defektes ermöglichen, sodass zuvor versiegelte Bakterien wieder Zugang zu fermentierbaren Kohlenhydraten haben und somit ihre Azidogenität aufrechterhalten können. Die vorliegende Studie untersuchte, ob und ab welcher Spaltgröße ein Überleben versiegelter Bakterien zu beobachten ist. Dazu wurden an den pulpoaxialen Wänden boviner Probenkörper künstliche, bakteriell kontaminierte demineralisierte Läsionen induziert und mit Kompositrestaurationen, die unterschiedliche Spaltgrößen aufwiesen, versiegelt. Vier verschiedene Spaltmaße wurden eingesetzt, um etwaige Schwellenwerte definieren zu können. Die Probenkörper wurden über einen 25-tägigen Zeitraum unter stark kariogenen Bedingungen zyklisch belastet. Nach der simulierten Versiegelungsphase wurde die Anzahl der versiegelten, überlebenden Bakterien bestimmt.

### **4.1. Ergebnisse der Studie**

Die Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass mit zunehmender Spaltgröße die Wahrscheinlichkeit des Überlebens versiegelter Bakterien steigt. In allen vier Versuchsgruppen war die Bakterienanzahl durch die Versiegelung signifikant reduziert worden, jedoch waren ab Spaltmaßen von 200 µm deutlich mehr Mikroorganismen nach der Versiegelung nachweisbar als unter den Restaurationen ohne oder mit nur 100 µm großen Spalten. Die Studie belegt, dass ab dem Schwellenwert der Spaltgröße ( $\geq 200 \mu\text{m}$ ) die Anzahl überlebender, versiegelter Mikroorganismen signifikant ansteigt. Allerdings nimmt die Bakterienanzahl nicht linear zur Spaltgröße zu; größere Spalten scheinen keinen zusätzlichen Einfluss auf das Überleben der Bakterien zu haben. Vermutlich ist ein ausreichender Flüssigkeitsaustausch und eine bakterielle Nährstoffversorgung bereits entlang von 200 µm Spalten möglich, vor allem, weil zudem kaubelastet wurde und somit Flüssigkeitsbewegungen befördert wurden. Auch für Sekundärkaries wurden Schwellengrößen von Spalten definiert (35, 36). Ab einer Schwellengröße über 400 µm des Restaurationsdefektes wurden signifikant mehr

Mikroorganismen unterhalb der Restaurationen nachgewiesen, als bei Probenkörper mit geringerer Defektgröße oder klinisch intakten Restaurationen (36). Zusätzlich belegte eine weitere Studie (37), dass das Restaurationsmaterial Einfluss auf die Dentindemineralisation hatte. So konnte nachgewiesen werden, dass Glasionomerzement -unabhängig von der Spaltbreite und im Gegensatz zu Komposit -den Demineralisationsprozess im Restaurationsbereich hemmen konnte. Auch Amalgam konnte bei simulierten Spaltsituationen dem Komposit gegenüber bei der Sekundärkariesprävention überlegen sein (38). Inwieweit sich diese Ergebnisse auf unsere Fragestellung übertragen lassen, bleibt unklar, vor allem, weil hier Versiegelungs- und antibakterielle Effekte zusammenspielen.

Die unterschiedlichen Studienergebnisse lassen vermuten, dass erstens das verwendete Restaurationsmaterial und zweitens die Randintegrität der Restauration einen Einfluss auf Flüssigkeits- und Bakterieneindringen entlang des Zahn-Restauration-Interfaces haben. Zusätzlich nimmt die Intensität der Belastung Einfluss auf die Flüssigkeitsdurchlässigkeit (Mikroleakage) entlang der Zahn-Restauration-Grenzflächen. Eine zyklische Belastung begünstigt die bakterielle Penetration auch entlang von Restaurationen mit geringer Spaltbreite (15–30 µm) und fördert so die Bildung von Sekundärkaries (30). Hingegen hat eine Belastung keinen Einfluss bei Restaurationen, die bereits Spaltränder von 300 µm aufweisen; hier ist eine Bakterienpenetration auch ohne zyklisches Loading möglich (31). Ein weiterer Faktor, der das Eindringen von Flüssigkeiten oder Bakterien beeinflussen könnte, ist die Spaltgeometrie. Ein besonders langer, tiefer Spalt (tiefer approximaler Kasten) könnte die Mikroleakage erschweren. Zusätzlich könnten Oberflächeneigenschaften und Elastizitäten des Restaurationsmaterials die Flüssigkeitsdynamik beeinflussen. Die Fluidodynamik könnte durch die Oberflächenbeschaffenheit modifiziert werden; steifere Materialien könnten die zyklische Belastung anders in eine Spaltkompression umsetzen als elastischere Materialien (39). Weitere Studien sind erforderlich, um die klinische Bedeutung unterschiedlicher Belastungen, Restaurationsmaterialien und Spaltgeometrien auf die Mikroleakage nachzuvollziehen.

## **4.2. Diskussion der Methodik**

### **4.2.1. Versuchsdurchführung**

Die Studie unterliegt einer Reihe von Einschränkungen, die in den folgenden Kapiteln diskutiert werden. Bovines Zahndentin wurde als Ausgangsmaterial verwendet, um das benötigte Probenkörpermindestmaß von  $5 \times 5$  mm zu realisieren. Dies ist mit humanem Dentin nicht zu realisieren. Da alle bovinen Incisivi von Rindern ähnlichen Alters und mit identischen Ernährungsgewohnheiten stammten, kann von einer vergleichbaren und einheitlichen Qualität ausgegangen werden. In Studien wurde nachgewiesen, dass zwischen bovinem und humanem Dentin nur geringe Differenzen im De- und Remineralisationsverhalten sowie Mineralverteilungen existierten (40, 41).

Weiterhin waren die Spaltgrößen innerhalb einer Gruppe nicht einheitlich konstant. Im Vorversuch wurden mithilfe eines Lichtmikroskops die Spalthöhen- und Kontinuitäten visualisiert und vermessen. Da die geringste Spaltgröße den limitierenden Faktor des Kohlenhydrattransportes darstellen könnte, wurde diese berücksichtigt. Da aber nur geringe Probenmengen auf diese Weise analysiert wurden, ist von Abweichungen innerhalb der Versuchsgruppen auszugehen (siehe Anhang 7.3).

Ein weiterer zu diskutierender Faktor bei der Spaltherstellung ist, dass das Adhäsiv nicht auf die Läsion aufgebracht wurde. Ziel der Studie war es, den Effekt der Versiegelung und Mikroleakage auf das bakterielle Überleben zu untersuchen. In klinischen Situationen würde die Läsion ebenfalls konditioniert werden. Die Vorbehandlung von Kavitäten mit Scotchbond Universal hat eine antibakterielle Wirkung, die zu einer signifikanten Reduzierung der bakteriellen Proliferation führt (42, 43).

### **4.2.2. Probenkörperdesign**

Bei der Auswahl der zu untersuchenden Spaltgrößen wurde versucht, klinisch relevante Größen abzudecken. Auch geringere Spaltgrößen (25  $\mu$ m und 50  $\mu$ m) wären jedoch möglicherweise von Interesse gewesen (unsere Ergebnisse lassen allerdings vermuten, dass dies nicht zu deutlich anderen Ergebnissen als für 0 und 100  $\mu$ m

Spalten geführt hätte). Die Herstellung kleinerer Spaltmaße ließ sich allerdings nicht mit der angewendeten Folienmethode realisieren.

Der 400 µm Spalt repräsentiert eine unakzeptable, deutlich sondierbare Defektgröße. Zahlreiche Studien (27, 30, 35, 44) zeigen, dass bei diesen Spaltdimensionen auch ohne zyklische Belastung der Proben Flüssigkeitsaustausche und bakterielle Penetrationen erfolgen (30, 35). Bei geringen Spaltgrößen von 30 µm erleichtert eine zusätzliche zyklische Belastung die bakterielle Penetration (30). Scheinbar wirkt sich der durch die Belastung hervorgerufene „Pump-Effekt“ auf den Substrattransport entlang geringer Grenzflächenlücken aus.

#### **4.2.3. Medien und Biofilmmodell**

In dieser Studie wurde ausschließlich eine Bakterienspezies (*LGG*) verwendet. Der *LGG*-Stamm hat besonders im Dentin ein stark kariogenes Potenzial (33), das bei unserem Versuchsablauf erwünscht war. *LGG* wird oft in tiefen kariösen Läsionen angetroffen (45); seine Verwendung war demnach gerechtfertigt.

Klinisch weisen dentale Biofilme eine individuellere und weitaus komplexere mikrobielle Zusammensetzung auf. Die exakte Simulation dessen ist unter In-vitro-Bedingungen schwierig (4). Die hier eingesetzten Läsionen haben demnach Modellcharakter (46). Im Vorfeld waren Demineralisations- und Inkubationsdauer getestet worden, um möglichst hohe bakterielle Kontaminationen zu ermöglichen, ohne gleichzeitig zu weiche Läsionen, die nicht mehr innerhalb des Modellsystems restaurierbar wären, zu generieren. Allerdings sind die erzeugten Läsionen wahrscheinlich klinischen, langsam induzierten Läsionen im Mineralverlustprofil und Härteverhalten nur bedingt ähnlich (47). Beide Faktoren spielten hier eine untergeordnete Rolle.

In dieser Studie wurde eine mit 2 % Saccharose beigefügte MRS-Bouillon als Nährmedium für *LGG* genutzt. Ein alternatives Nährmedium stellte die Brain Heart Infusion (BHI) dar. BHI zeichnet sich allerdings im Gegensatz zur MRS (pH 5,4) durch einen höheren pH-Wert (7,4) aus, der auch anderen Mikroorganismen ideale Wachstumsbedingungen bietet. Die Kontaminationsgefahr wäre höher gewesen.

Allerdings ist anzunehmen, dass MRS selbst auch demineralisierend wirkt; die vorliegende Studie ging auf die Relevanz dieser Demineralisierung nicht ein.

Während der Simulationsphase herrschte in der Kammer eine Luftfeuchtigkeit von 100 % und eine Temperatur des Saccharosemediums von 37 °C. Mit diesen Bedingungen wurde versucht, die in der menschlichen Mundhöhle herrschenden Gegebenheiten zu imitieren und somit ideale Wachstumsbedingungen für *LGG* zu simulieren. Die Mundhöhle bietet mit ihrer Temperatur von circa 36 °C einen idealen Lebensraum für Mikroorganismen (48). Die stetige Verfügbarkeit fermentierbarer Kohlenhydrate gewährleistete eine hohe *LGG*-Keimzahl und beeinflusste die Demineralisation bzw. die Läsionsprogression (33). In Hinblick auf die gewählten Bedingungen unterlag die vorliegende Studie einigen Einschränkungen. So wurde während der Simulationsphase kein künstlicher Speichel verwendet und somit der Einfluss der Speichelclearance auf den pH-Wert in der Studie nicht berücksichtigt. Zudem war es nicht möglich, eine pH-Wert-Analyse direkt im Biofilm durchzuführen.

#### **4.2.4. Versiegelungsperiode**

In der vorliegenden Studie wurden die Probenkörper in der computergesteuerten Kaumaschine einem hochkariogenen Milieu mit parallel zyklischer Bekauung ausgesetzt. Die konstruierten Laborbedingungen konnten nicht alle auf die Spaltrestorationen wirkenden Kräfte, die unter In-vivo-Bedingungen existieren, simulieren. Unsere In-vitro-Studie dient der relativen Einschätzung zur Einflussnahme von Restaurationsspalten auf die Progression von Residualkaries. Während der Versiegelungsphase wurden die in der Mundhöhle existierenden Faktoren (37 °C, hohe Luftfeuchtigkeit, Belastung, Substratzufuhr) imitiert. Die konstant simulierte Substratzufuhr und Belastung wäre klinisch allerdings unwahrscheinlich, sodass dies bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss. So konnten bereits nach einer Versuchsdauer von 25 Tagen signifikante Unterschiede innerhalb der Probengruppen festgestellt werden.

Eine weitere Einschränkung der Studie besteht in der einheitlich geringen Belastung der Probenkörper. Die Stahlpins zur Simulation von Antagonistenkontakten während der Mastikation übertrugen präzise geringe Kraftimpulse auf die Probenkörper, um



eine Kompression innerhalb des Spaltes zu erzielen. Der Kausimulator wurde hierfür in minimaler Geschwindigkeit programmiert. Die Simulation maximaler Kaukräfte (49) waren in unserer Studie nicht vorgesehen. Ziel war vielmehr, einen Flüssigkeitsaustausch entlang der Spaltgrenzflächen zu erzeugen und einen „Pump-Effekt“ zu erzielen. Die auf die Probenkörper wirkenden Kräfte wurden nicht gemessen, sondern auf Grundlage eines Gewichtes mit einem Kilogramm, welches sich jeweils auf 24 Probenkörper verteilte, berechnet. Andere Kaukräfte, aber auch andere Materialien hätten vermutlich das bakterielle Überleben modifizieren können (39). Auch individuell schwankende Kaukräfte und Kraftvektoren sind mögliche Modifikationen.

#### **4.2.5. Bakteriellles Überleben**

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie basieren auf der Kultivierung und Quantifizierung der in den Läsionen vorhandenen lebensfähigen *LGG*-Mikroorganismen. Dafür wurden die Bakteriensuspensionen auf MRS-Agar verteilt, so dass die koloniebildenden Einheiten (KbE/CFU) pro mg nach 48-stündiger Wachstumsphase ermittelt werden konnten. Das Verfahren ist eine geeignete und etablierte Methode zur Bestimmung bakteriellen Überlebens (50). Allerdings ist das Auszählen teilweise mit Fehlern behaftet, u.a. wenn Kolonien dicht beieinander liegen und demnach als eine statt zweier KbE erkannt werden. Die Quantifizierung wird zudem durch Medium, Brutschrankbedingungen und Dauer der Kultivierungsphase bestimmt. Da diese über alle Gruppen konstant waren, ist nicht von systematischen Verzerrungen auszugehen. Die Methodik der KbE-Bestimmung kommt bei Multispeziesbiofilmen (s.o.) an ihre Grenzen, so dass dann molekularbiologische Methoden eingesetzt werden sollten. Diese sind jedoch entweder sehr aufwändig oder quantifizieren auch tote, nicht überlebende Bakterien.

#### **4.3. Ausblick**

Unsere In-vitro-Studie erlaubt es nicht, alle in der Mundhöhle vorherrschende Faktoren zu berücksichtigen; eine unkritische Übertragung unserer Ergebnisse auf die klinische Situation ist nicht möglich. Zukünftige laborexperimentelle wie auch klinische Studien sind nötig, um die Auswirkungen unterschiedlicher Belastungen im Zusammenhang

von Spaltmaßen und bakteriellem Überleben zu verstehen und deren Relevanz auf den klinischen Alltag deuten zu können. Faktoren wie Belastungsstärke und Materialelastizitäten wurden mittlerweile untersucht (39). Tiefergreifende fluiddynamische Analysen könnten helfen, Substratströmungen in den Spalten zu verstehen und könnten helfen, In-vitro-Ergebnisse mit In-silico-Daten zu triangulieren. Klinisch relevant wäre die Aufklärung von Faktoren, die eine solche Flüssigkeitsbewegungen oder gar bakterielle Penetration entlang von Restaurationsspiralen erlauben, bspw. das Füllungsmaterial, die Kavitäten- bzw. Spaltkonfiguration, etwaige Verarbeitungsfehler etc. Zahnärzte werden vor allem interessiert daran sein zu erfahren, ob die selektive Exkavation auch unter suboptimalen restaurativen Bedingungen erfolgreich sein kann. Diesen Beweis kann die vorliegende Arbeit nicht liefern.

## 5. Zusammenfassung

Nach einer selektiven Exkavation werden Bakterien unter der Restauration versiegelt. Insuffiziente Restaurationen, die einen Spalt aufweisen, könnten diesen versiegelten Bakterien wieder Zugang zu fermentierbaren Kohlenhydraten ermöglichen. Dies könnte zu einer Läsionsprogression und langfristig zur Schädigung der Pulpa führen. Unklar ist, ob ein hierfür ausreichender Flüssigkeitsaustausch entlang des Zahn-Restauration-Interfaces erfolgt und ob der Spalt dafür eine bestimmte minimale Größe aufweisen muss. Die durchgeführte In-vitro-Studie untersuchte, wie sich verschiedene Spaltgrößen auf das Überleben zuvor versiegelter Bakterien auswirkten. Mithilfe eines Biofilmmodells wurden an den pulpoaxialen Wänden boviner Dentinproben mit *Lactobacillus rhamnosus* kontaminierte kariöse Läsionen erzeugt. Diese wurden dann restaurativ versorgt, wobei die Restaurationen unterschiedlich große Spalten (0/100/200/400 µm; n = 24/Gruppe) aufwiesen. Im Kausimulator wurden die Probenkörper unter hochkariogenen Bedingungen geringfügig zyklisch belastet (42 g/0,2 Hz). Nach einer Versuchsdauer von 25 Tagen wurde die Anzahl der versiegelten lebensfähigen Bakterien (koloniebildende Einheiten) ermittelt. Die Ergebnisse zeigen, dass erstens eine signifikante Reduzierung der Mikroorganismen durch die Versiegelung stattfand und zweitens, dass ab einer Spaltgröße von 200 µm deutlich mehr überlebensfähige Bakterien vorhanden waren. Ab einer definierten Spaltgröße scheint ein Substrataustausch entlang eines Restaurationsdefektes möglich. Das Belassen kariösen Dentins setzt dicht versiegelnde Restaurationen voraus.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Vos T, Abajobir A, Abate K, Abbafati C, Abbas K, Abd-Allah F, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet*. 390(10100):1211-59.
2. Jordan RA, Bodechtel C, Hertrampf K, Hoffmann T, Kocher T, Nitschke I, et al. The Fifth German Oral Health Study (Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie, DMS V) - rationale, design, and methods. *BMC Oral Health*. 2014;14:161.
3. Geyer S, Schneller T, Micheelis W. Social gradients and cumulative effects of income and education on dental health in the Fourth German Oral Health Study. *Community dentistry and oral epidemiology*. 2010;38(2):120-8.
4. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health*. 2006;6(Suppl 1):14.
5. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Advances in dental research*. 1994;8(2):263-71.
6. Minah GE, Lovekin GB, Finney JP. Sucrose-induced ecological response of experimental dental plaques from caries-free and caries-susceptible Human volunteers. *Infection and Immunity*. 1981;34(3):662-75.
7. Abou Neel EA, Aljabo A, Strange A, Ibrahim S, Coathup M, Young AM, et al. Demineralization-remineralization dynamics in teeth and bone. *International journal of nanomedicine*. 2016;11:4743-63.
8. Paris S, Ekstrand K, Meyer-Lückel H. Histologisches und klinisches Erscheinungsbild der Karies. *Karies, Wissenschaft und klinische Praxis*. 2012:43-64.
9. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology Society*. 2003;149(Pt 2):279-94.
10. Paris S, Ekstrand K, Meyer-Lückel H. Paradigmenwechsel. *Karies, Wissenschaft und klinische Praxis*. 2012:73-4
11. Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. *Archives of oral biology*. 1960;1:304-20.
12. Schwendicke F, Frencken JE, Bjørndal L, Maltz M, Manton DJ, Ricketts D, et al. Managing Carious Lesions: Consensus Recommendations on Carious Tissue Removal. *Advances in dental research*. 2016;28(2):58-67.

13. Bjorndal L, Reit C, Bruun G, Markvart M, Kjaeldgaard M, Nasman P, et al. Treatment of deep caries lesions in adults: randomized clinical trials comparing stepwise vs. direct complete excavation, and direct pulp capping vs. partial pulpotomy. *European journal of oral sciences*. 2010;118(3):290-7.
14. Schwendicke F, Meyer-Lueckel H, Dorfer C, Paris S. Attitudes and behaviour regarding deep dentin caries removal: a survey among German dentists. *Caries research*. 2013;47(6):566-73.
15. Schwendicke F, Paris S. Kariesexkavation: Ein systematischer Überblick. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*. 2014;69:456–66.
16. Handelman SL, Washburn F, Wopperer P. Two-year report of sealant effect on bacteria in dental caries. *The Journal of the American Dental Association*. 1976;93(5):967-70.
17. Oong EM, Griffin SO, Kohn WG, Gooch BF, Caufield PW. The effect of dental sealants on bacteria levels in caries lesions: a review of the evidence. *The Journal of the American Dental Association*. 2008;139(3):271-8; quiz 357-8.
18. Mertz-Fairhurst EJ, Schuster GS, Williams JE, Fairhurst CW. Clinical progress of sealed and unsealed caries. Part I: Depth changes and bacterial counts. *Journal of Prosthetic Dentistry*. 1979;42(5):521-6.
19. Maltz M, de Oliveira EF, Fontanella V, Bianchi R. A clinical, microbiologic, and radiographic study of deep caries lesions after incomplete caries removal. *Quintessence International*. 2002;33(2):151-9.
20. Handelman SL, Leverett DH, Espeland MA, Curzon JA. Clinical radiographic evaluation of sealed carious and sound tooth surfaces. *The Journal of the American Dental Association*. 1986;113(5):751-4.
21. Bjorndal L, Larsen T, Thylstrup A. A clinical and microbiological study of deep carious lesions during stepwise excavation using long treatment intervals. *Caries research*. 1997;31(6):411-7.
22. Kidd EA. Microleakage: a review. *Journal of dentistry*. 1976;4(5):199-206.
23. Celiberti P, Lussi A. Penetration ability and microleakage of a fissure sealant applied on artificial and natural enamel fissure caries. *Journal of dentistry*. 2007;35(1):59-67.
24. Naaman R, El-Housseiny AA, Alamoudi N. The Use of Pit and Fissure Sealants- A Literature Review. *Dentistry Journal (Basel)*. 2017;5(4).

25. Duangthip D, Lussi A. Microleakage and penetration ability of resin sealant versus bonding system when applied following contamination. *Pediatric dentistry*. 2003;25(5):505-11.
26. Maske TT, Kuper NK, Cenci MS, Huysmans M. Minimal Gap Size and Dentin Wall Lesion Development Next to Resin Composite in a Microcosm Biofilm Model. *Caries research*. 2017;51(5):475-81.
27. Totiam P, Gonzalez-Cabezas C, Fontana MR, Zero DT. A new in vitro model to study the relationship of gap size and secondary caries. *Caries research*. 2007;41(6):467-73.
28. Hodges DJ, Mangum FI, Ward MT. Relationship between gap width and recurrent dental caries beneath occlusal margins of amalgam restorations. *Community dentistry and oral epidemiology*. 1995;23(4):200-4.
29. Derand T, Birkhed D, Edwardsson S. Secondary caries related to various marginal gaps around amalgam restorations in vitro. *Swedish dental journal*. 1991;15(3):133-8.
30. Khvostenko D, Salehi S, Naleway SE, Hilton TJ, Ferracane JL, Mitchell JC, et al. Cyclic mechanical loading promotes bacterial penetration along composite restoration marginal gaps. *Dental Materials Journal*. 2015;31(6):702-10.
31. Kuper NK, Opdam NJ, Bronkhorst EM, Ruben JL, Huysmans MC. Hydrodynamic flow through loading and in vitro secondary caries development. *Journal of dental research*. 2013;92(4):383-7.
32. Qvist V. The effect of mastication on marginal adaptation of composite restorations in vivo. *Journal of dental research*. 1983;62(8):904-6.
33. Schwendicke F, Dorfer C, Kneist S, Meyer-Lueckel H, Paris S. Cariogenic effects of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in a dental biofilm model. *Caries research*. 2014;48(3):186-92.
34. Kneist S, Schmidt F, Callaway A, Willershausen B, Rupf S, Wicht M, et al. Diversity of *Lactobacillus* species in deep carious lesions of primary molars. *European Archives Paediatric Dentistry*. 2010;11(4):181-6.
35. Nassar HM, Gonzalez-Cabezas C. Effect of gap geometry on secondary caries wall lesion development. *Caries research*. 2011;45(4):346-52.
36. Kidd EA, Joyston-Bechal S, Beighton D. Marginal ditching and staining as a predictor of secondary caries around amalgam restorations: a clinical and microbiological study. *Journal of dental research*. 1995;74(5):1206-11.

37. Cenci MS, Pereira-Cenci T, Cury JA, Ten Cate JM. Relationship between gap size and dentine secondary caries formation assessed in a microcosm biofilm model. *Caries research*. 2009;43(2):97-102.
38. Kuper NK, Montagner AF, van de Sande FH, Bronkhorst EM, Opdam NJ, Huysmans MC. Secondary Caries Development in in situ Gaps next to Composite and Amalgam. *Caries research*. 2015;49(5):557-63.
39. Askar H, Brouwer F, Lehmensiek M, Paris S, Schwendicke F. The association between loading of restorations and secondary caries lesions is moderated by the restoration material elasticity. *Journal of dentistry*. 2017;58:74-9.
40. Lippert F, Churchley D, Lynch RJ. Effect of Lesion Baseline Severity and Mineral Distribution on Remineralization and Progression of Human and Bovine Dentin Caries Lesions. *Caries research*. 2015;49(5):467-76.
41. Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. *Caries Res*. 2003;37(5):339-44.
42. Brandt PD, de Wet FA, Botha SJ, de Wet BJ. Anti-bacterial efficacy of new self-etching dentine bonding agent. *SADA Journals*. 2004;59(7):280, 2.
43. Herrera M, Carrion P, Bravo M, Castillo A. Antibacterial activity of four dentin bonding systems. *International journal of antimicrobial agents*. 2000;15(4):305-9.
44. Diercke K, Lussi A, Kersten T, Seemann R. Isolated development of inner (wall) caries like lesions in a bacterial-based in vitro model. *Clinical oral investigations*. 2009;13(4):439-44.
45. Caufield PW, Schon CN, Saraithong P, Li Y, Argimon S. Oral Lactobacilli and Dental Caries: A Model for Niche Adaptation in Humans. *Journal of dental research*. 2015;94(9 Suppl):110s-8s.
46. Seemann R, Kluck I, Kage A. An in vitro microbial-based model for studying caries-preventive agents. *Acta odontologica Scandinavica*. 2006;64(1):27-30.
47. White DJ. The application of in vitro models to research on demineralization and remineralization of the teeth. *Advances in dental research*. 1995;9(3):175-93; Discussion 94-97.
48. Bradshaw DJ, Marsh PD. Use of continuous flow techniques in modeling dental plaque biofilms. *Methods in enzymology*. 1999;310:279-96.
49. Takaki P, Vieira M, Bommarito S. Maximum Bite Force Analysis in Different Age Groups. *International Archives of Otorhinolaryngology*. 2014;18(3):272-6.

50. Wohlsen T, Bates J, Vesey G, Robinson WA, Katouli M. Evaluation of the methods for enumerating coliform bacteria from water samples using precise reference standards. *Letters in Applied Microbiology*. 2006;42(4):350-6.
51. De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME. A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*. 1960;23(1):130-5.



## 7. Anhang

### 7.1. Materialien

- Aqua dest.: „Ampuwa®“ Spüllösung, Fresenius Kabi, Bad Homburg
- Autoklav: Tuttnauer Laborautoklav 3870 ELV, Biomedis, Gießen
- Bandsäge: EXAKT Trennschleifsystem 300cl, 0,2 mm, Exakt Apparatebau, Norderstedt
- Bench: Bleyemehl Reinraumtechnik, Inden
- bovine Incisivi: Unifleisch Schlachthof, Erlangen
- Brut- /Wärmeschrank: Venticell 404, MMM Medcenter GmbH, Planegg
- Buskes-Bestandteile: überwiegend Merck, Darmstadt
- Chloramin T-Lösung, 0,5 %
- Elastomere-Abformbasismasse: Silaplast-futur, Detax, Ettlingen
- Falcon-Röhrchen: Zentrifugenröhrchen, 50 ml, VWR, Darmstadt
- Feinwaage: Analytical Plus, Ohaus, Nänikon, Schweiz
- Kausimulator: CS-4.8, Willytec, Feldkirchen-Westerham
- Keramikbohrer: REF 806314, Hager & Meisinger, Neuss
- Komposit: Luxacore, DMG, Hamburg; Tetric EvoCeram Komposit: Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein
- Kühlschrank: AEG Santo, Electrolux Hausgeräte, Nürnberg
- Kupferfolienstücke: Gemmel Metalle, Berlin
- Lactobacillus rhamnosus*: DSM 20247, DSMZ, Braunschweig
- LED-Polymerisationslampe: Valo, Ultradent, Salt Lake City, USA
- MRS-Medium: deMan-Rogosa-Sharpe, Medium, Roth, Karlsruhe
- Multikanalpumpe: 8152 Standard, MCP, Glattbrugg
- NaCl 0,9 %: physiologische Kochsalzlösung, B. Braun Melsungen AG, Bad Homburg
- Nagellack: Rival de Loop, Rossmann, Hannover
- Peristaltikpumpe: Seko GmbH, Mainz-Kastel
- pH-Messsonde: InLab Micro, Mettler-Toledo, Gießen
- Pipettenboxen: Quality Pipette Tips, Sarstedt, Nümbrecht
- Rosenbohrer: 1,4 mm; schmaler Schaft, Hager & Meisinger, Neuss
- Saccharose: (D+)-Saccharose, 2 %, Roth, Karlsruhe
- Schleifpapier: Mikroschleifsystem 400CS, Buehler, Düsseldorf

- Sekundenkleber: UHU dent, UHU GmbH, Bühl (Baden)
- Self-Etch-Adhäsiv: Scotchbond Universal, 3 M Espe, St. Paul, USA
- Skalpelle: Aesculap Sicherheitsskalpell, Braun, Melsungen
- Stereomikroskop: Stemi SV11 mit AxioCam, Zeiss, Oberhausen
- Sterilisationsklebeband: Brömeda Amcor, Sassenberg-Füchtorf
- Technovit 4071: Methylmethakrylat; Heraeus Kulzer, Hanau
- Tubes: Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
- Ultraschallscaler: Sirona Dental, Wals bei Salzburg, Österreich
- Vortexer: Genie 2, BENDER & HOBEIN, Zürich, Schweiz
- Wasserbad: KÖTTERMANN 3048, Wasserbad mit Umwälzung, Uetze/Hänigsen
- Zuflussschlauch: Silicone Tubing, VWR International, Darmstadt
- 3-Stopper-Schläuche: ISMATEC, Wertheim
- 5 l Flasche: DURAN Laborflasche, DURAN Group, Wertheim

## 7.2. Medien

Tabelle 2: Zusammensetzung der MRS-Bouillon (deMan, Rogosa und Sharpe) (51)

Zusammensetzung	Menge in g/l
Pepton	10 g/l
Hefeextrakt	4 g/l
Rindfleischextrakt	8 g/l
Glucose	20 g/l
Dikaliumphosphat	2 g/l
Natriumacetat	5 g/l
Ammoniumcitrat	2 g/l
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	0,2 g/l
Mangansulfat	0,05 g/l
Polysorbat 80	1 g/l
(pH-Wert)	(6,2 ±0,2)

### **7.3. Vorversuch zur Spalthöhe- und Kontinuität**

Im Vorversuch wurden die Spalthöhen- und Kontinuitäten optisch dargestellt und vermessen. Es wurden jeweils vier Probenkörper pro Spaltgröße (insgesamt  $n = 16$ ) untersucht. Mithilfe der EXAKT-Trennsäge wurden die 16 restaurierten Probenkörper zweimal in sagittaler Richtung (von der Außenfläche bis zur Läsion) durchgesägt. Die Höhe und Kontinuität der jeweils entstandenen Probenkörperscheiben konnte bei 2,5-facher Vergrößerung mittels Stereomikroskop (Stemi SV11, Zeiss, Oberhausen, Österreich) untersucht und digital analysiert werden (AxioCam, Zeiss, Jena). Dabei wurde die kleinste Spaltgröße im Sagittalschnitt berücksichtigt. Die Spalten waren frei zugänglich und reichten bis zum Läsionsbereich. So konnten im Vorfeld ein Verschluss des Spaltes durch Komposit oder stärkere Größenschwankungen innerhalb des Spaltes ausgeschlossen werden.

Folgende Höhen wurden gemessen (Mittelwert, Min.-Max.):

- Gruppe 100  $\mu\text{m}$ : 121 (108–129)  $\mu\text{m}$
- Gruppe 200  $\mu\text{m}$ : 220 (180–248)  $\mu\text{m}$
- Gruppe 400  $\mu\text{m}$ : 450 (440–490)  $\mu\text{m}$

### **7.4. Vorversuch zu Belastungseinflüssen auf Spaltgrößen**

Der Vorversuch untersuchte den Einfluss der Belastung entlang des Spaltes. Es stellte sich heraus, dass bei einer 1 kg starken Belastung pro Stempel der Kaumaschine die mittlere Spalthöhenreduktion ca. 10 % (Bereich: 9-13 %) betrug. Dies bedeutete pro Probenkörper eine Belastung mit 42 Gramm. Die Belastung wurde mit niedriger Frequenz (0,2 Hz) und geringer Belastungszeit (6 s) appliziert, um eine vollständige Komprimierung des Spaltes und eine durch Ermüdung der Probenkörper und eine damit verbundene stärkere Spaltdeformation zu verhindern. Über die 25-tägige Belastungsphase wiesen die Probenkörper keine signifikante Alterung auf.

## 8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Charlotta Diederich, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss von Restaurationsspalten auf die Progression von Residualkariesläsionen *in vitro*“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## 9. Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Publikation 1: Falk Schwendicke, Charlotta Diederich, Sebastian Paris, Restoration gaps needed to exceed a threshold size to impede sealed lesion arrest in vitro, Journal of Dentistry, 2016

Betrag im Einzelnen:

- Schwendicke, Falk entwickelte die Studie, analysierte und interpretierte die Daten, schrieb das Paper und überprüfte das Manuskript.
- Diederich, Charlotta entwickelte die Studie mit, führte das Studiendesign und die mikrobiellen Analysen durch, interpretierte die Daten und verfasste das Manuskript.
- Paris, Sebastian analysierte, interpretierte die Daten und überprüfte das Manuskript.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift von Charlotta Diederich

## **10. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **11. Danksagung**

Zum Abschluss dieser Arbeit möchte ich bei meinem Doktorvater Herrn OA Priv.-Doz. Dr. Falk Schwendicke (Abteilung für Zahnerhaltung und Präventivzahnmedizin, Charité – Universitätsmedizin Berlin) für die freundliche Bereitstellung des Themas und die zuverlässige Betreuung meiner Dissertationsarbeit ganz herzlich bedanken. PD Dr. Falk Schwendicke stand mir stets hilfsbereit und tatkräftig zur Seite. Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Sebastian Paris für die Möglichkeit, die Geräte und Räumlichkeiten der Abteilung für Zahnerhaltung und Präventivzahnmedizin, Charité – Universitätsmedizin Berlin nutzen zu dürfen.

Weiterhin möchte ich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Abteilung für Zahnerhaltung und Präventivzahnmedizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin bedanken- insbesondere bei OA Dr. Uwe Blunck, Dr. Haitham Askar, Carola Schweynoch, Rainer Toll und Dr. Herbert Renz für ihre Hilfsbereitschaft bei den praktischen Arbeitsschritten sowie der technischen Umsetzung.

Nicht zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner tollen Familie und meinem Freund Felix Schulze für seine unerlässliche Geduld, Motivation und emotionale Unterstützung herzlich bedanken.